

523.42982X00

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant(s): KAWAZOE, et al.  
Serial No.: Not assigned  
Filed: July 29, 2003  
Title: ELECTROPHORESIS MEMBER, PRODUCTION THEROF AND  
CAPILLARY ELECTROPHORESIS APPARATUS  
Group: Not assigned

LETTER CLAIMING RIGHT OF PRIORITY

Mail Stop Patent Application  
Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

July 29, 2003

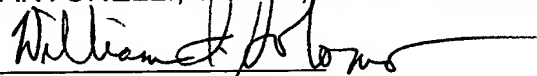
Sir:

Under the provisions of 35 USC 119 and 37 CFR 1.55, the applicant(s) hereby  
claim(s) the right of priority based on Japanese Application No.(s) 2002-244676 filed  
August 26, 2002.

A certified copy of said Japanese Application is attached.

Respectfully submitted,

ANTONELLI, TERRY, STOUT & KRAUS, LLP



William I. Solomon  
Registration No. 28,565

WIS/amr  
Attachment  
(703) 312-6600

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 8月26日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-244676

[ ST.10/C ]:

[ JP2002-244676 ]

出 願 人

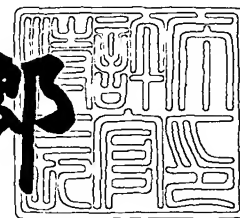
Applicant(s):

日立化成工業株式会社  
株式会社日立製作所

2003年 5月27日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3040383

【書類名】 特許願

【整理番号】 14500820

【提出日】 平成14年 8月26日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 21/01

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県下館市大字小川 1 5 0 0 番地 日立化成工業株式  
会社 総合研究所内

    【氏名】 河添 宏

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県下館市大字小川 1 5 0 0 番地 日立化成工業株式  
会社 下館事業所内

    【氏名】 鎌田 智之

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県下館市大字小川 1 5 0 0 番地 日立化成工業株式  
会社 下館事業所内

    【氏名】 高橋 淳

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0 番地 株式会社日  
立製作所 中央研究所内

    【氏名】 曾根原 剛志

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0 番地 株式会社日  
立製作所 中央研究所内

    【氏名】 井戸 立身

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0 番地 株式会社日  
立製作所 中央研究所内

    【氏名】 原田 邦男

【特許出願人】

【識別番号】 000004455

【氏名又は名称】 日立化成工業株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000005108

【氏名又は名称】 株式会社日立製作所

【代理人】

【識別番号】 100086494

【弁理士】

【氏名又は名称】 穂高 哲夫

【電話番号】 03-3545-9020

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 037420

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9722031

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 電気泳動部材、その製造方法及びキャピラリ電気泳動装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 第一の支持層、第一の接着剤層及び第二の支持層を有する第一の支持体と複数のキャピラリとを有する電気泳動部材であって、該第一の接着剤層が該第一の支持層上に形成されており、該複数のキャピラリが該第一の接着剤層に敷設されてキャピラリ層を形成しており、該キャピラリ層上に該第二の支持層が形成されており、該複数のキャピラリは、該第一の支持体が部分的に取り除かれて露出した窓部と、該第一の支持体の一方の端部が取り除かれて露出した試料注入部とを有し、該試料注入部は該複数のキャピラリの一方の先端部を含み、窓部及び試料注入部の各部において該複数のキャピラリが軸を一平面上で並列させて配列されており、該窓部において該複数のキャピラリの軸に直交する一つの平面と各キャピラリとの交点として定義される該複数のキャピラリの検出部から、該試料注入部の先端部までの全てのキャピラリの長さが等しいことを特徴とした電気泳動部材。

【請求項 2】 該複数のキャピラリがガラスキャピラリであることを特徴とした請求項 1 に記載の電気泳動部材。

【請求項 3】 該第一の支持体が、該キャピラリ層と該第二の支持層との間に第二の接着剤層を有することを特徴とした請求項 1 又は 2 いずれかに記載の電気泳動部材。

【請求項 4】 該複数のキャピラリの最外層にコーティング層が形成されており、該検出部を含む該窓部の一部或いは全部で該コーティング層が剥離されていることを特徴とした請求項 1 ～ 3 いずれかに記載の電気泳動部材。

【請求項 5】 該試料注入部での該複数のキャピラリの配列の間隔が 9 m m の整数分の 1 であることを特徴とした請求項 1 ～ 4 いずれかに記載の電気泳動部材。

【請求項 6】 該検出部前後の該複数のキャピラリを支持する第二の支持体を有することを特徴とした請求項 1 ～ 5 いずれかに記載の電気泳動部材。

【請求項 7】 該第一の支持体が、該窓部を含む開口部を有することを特徴

とした請求項 1 ～ 6 いずれかに記載の電気泳動部材。

【請求項 8】 以下の①～③の工程を備えることを特徴とした電気泳動部材の製造方法。

①第一の支持層上に形成された第一の接着剤層に、数値制御された敷設装置を用いて、複数のキャピラリを、該複数のキャピラリの軸に直行する一つの平面と各キャピラリとの交点として定義される該複数のキャピラリの検出部から、各キャピラリの一方の先端部を含む試料注入部の各キャピラリの該先端部までの長さが、全てのキャピラリで同じになるように、また少なくとも該検出部とその周辺からなる窓部及び該試料注入部各個所において、該複数のキャピラリが軸を一平面で並列させて配列されるように敷設してキャピラリ層を形成する工程；

②該キャピラリ層上に第二の支持層を積層する工程；及び

③該第一の支持層、該第一の接着剤層及び該第二の支持層を部分的に取り除いて、該複数のキャピラリの該窓部及び該試料注入部を露出させる工程。

【請求項 9】 以下の①～③の工程を備えることを特徴とした電気泳動部材の製造方法。

①第一の支持層上に形成された第一の接着剤層に、数値制御された敷設装置を用いて、複数のキャピラリを、該複数のキャピラリの軸に直行する一つの平面と各キャピラリとの交点として定義される検出部から、各キャピラリの一方の先端部を含む試料注入部の各キャピラリの該先端部までの長さが、全てのキャピラリで同じになるように、また少なくとも該検出部とその周辺からなる窓部及び該試料注入部各個所において、該複数のキャピラリが軸を一平面で並列させて配列されるように敷設してキャピラリ層を形成する工程；

②該キャピラリ層上に、表面に第二の接着剤層を有した第二の支持層を、第二の接着剤層が該キャピラリ層に接するように配置して積層する工程；及び

③該第一の支持層、該第一の接着剤層、該第二の接着剤層及び該第二の支持層を部分的に取り除いて、該複数のキャピラリの該窓部及び該試料注入部を露出させる工程。

【請求項 10】 該複数のキャピラリがガラスキャピラリであることを特徴とした請求項 8 又は 9 に記載の電気泳動部材の製造方法。

【請求項 1 1】 該複数のキャピラリとして、最外層にコーティング層が形成されたガラスキャピラリを用いて、該検出部を含む該窓部の一部或いは全部となる個所の該コーティング層を剥離する工程を備えることを特徴とした請求項 8 ～ 1 0 いずれかに記載の電気泳動部材の製造方法。

【請求項 1 2】 該複数のキャピラリを敷設する際、該複数のキャピラリに荷重を加えることを特徴とした請求項 8 ～ 1 1 のいずれかに記載の電気泳動部材の製造方法。

【請求項 1 3】 該複数のキャピラリを敷設する際、該第一の接着剤層及び／又は該複数のキャピラリに、熱となるエネルギーを印加することを特徴とした請求項 8 ～ 1 2 のいずれかに記載の電気泳動部材の製造方法。

【請求項 1 4】 請求項 7 に記載の電気泳動部材、及び、レーザ光線を該開口部において反射し、該複数のキャピラリの軸が並列している平面に平行な方向から、該複数のキャピラリの該検出部に照射する手段を有することを特徴とするキャピラリ電気泳動装置。

# 【発明の詳細な説明】

## 【0 0 0 1】

### 【発明の属する技術分野】

本発明は、DNA、RNA 或いはたんぱく質などの高分子物質を分析する電気泳動装置、特に DNA シーケンサーなどで用いる電気泳動部材とその製造方法に関する。

## 【0 0 0 2】

### 【従来の技術】

DNA 塩基の配列を決定する技術として、複数の DNA 断片を含んだ液を電気泳動により分離して、DNA 断片の蛍光を検出する方法がある。従来はスラブゲル電気泳動法という平板ガラスの間にゲルを充填し電気泳動を行う方法をとっていた。電気泳動による分離の速度を上げるためには、ゲル厚を薄くし高電圧をかける必要があるが、発熱の問題により印加電圧には限界があった。

そこで新たに開発された技術が、内径 5 0 ～ 1 0 0  $\mu$  m 程度の石英毛细管を用いるキャピラリ電気泳動法である。キャピラリは発熱を低減できるため、スラブ

ゲル電気泳動法と比較し、より高い電圧を印加することができ、分離速度を10倍以上に向上させることができる。現在はこのキャピラリを数本～100本程度配した「キャピラリアレイ」を用いた全自動のマルチキャピラリシステムの採用が盛んである。

#### 【0003】

ところで、マルチキャピラリアレイシステムでは、蛍光を励起するための光を複数のキャピラリに照射する必要があるため、特別の工夫が必要である。ビームをスキャンする方式、ビームを広げて照射する方式、複数の光源を備える方式などが開発されてきたが、照射効率・分析感度が低いことや光源が複数必要で高コストといった問題があった。これに対して特開平9-96623号公報の方式は、複数のキャピラリを配列した平面内においてキャピラリに対して垂直に光を照射し、該光線をキャピラリ自体のレンズ効果を利用して複数のキャピラリに照射するというものである。このマルチフォーカス方式と称されている方式によって、一つの光源で高感度な分析が出来るようになってきた。

一方、米国特許第5,958,694号明細書などに記載されているチップキャピラリ電気泳動法という方法が近年注目されている。ガラス板や石英板の表面にエッチング等により幅及び深さが数10 $\mu$ m程度の流路（キャピラリ）を形成し、この流路で電気泳動を行うという方法である。ここで使用する基板は電気泳動チップなどと呼ばれている。電気泳動チップは、通常の毛細管（キャピラリ）より放熱効果が高く、流路の短縮や高密度化が容易といった特長がある。しかし、試料注入の際、試料を反応チューブから手作業（ピペッティング）でチップへ移し変えなければならず、多量の分析を高速に行う場合などには適当な方法ではない。

#### 【0004】

##### 【発明が解決しようとする課題】

従来のキャピラリアレイはキャピラリを一本ずつ組み立て治具を用いて束ねるように作製する。キャピラリ本数が増えるに従い、キャピラリの束がかさ高くなり、そのための装置内のスペースが必要になり、装置の小型化が難しくなる。また、キャピラリアレイの製造工数や時間が増大し、キャピラリ折損などといった



不具合も増加する。完成したアレイにおいてもキャピラリの大部分は空中に浮いた状態にあり、ユーザの取扱いによって破損しやすい。また、キャピラリの周囲が空気であるため放熱効率が悪い。

本発明は、精度よくコンパクトにキャピラリが配列され、取り扱い易く、放熱効率の良い電気泳動部材を提供すること、及び、そのような電気泳動部材を効率よく製造する方法を提供することを目的とする。

#### 【 0 0 0 5 】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明は、第一の支持層、第一の接着剤層及び第二の支持層を有する第一の支持体と複数のキャピラリとを有する電気泳動部材であって、該第一の接着剤層が該第一の支持層上に形成されており、該複数のキャピラリが該第一の接着剤層に敷設されてキャピラリ層を形成しており、該キャピラリ層上に該第二の支持層が形成されており、該複数のキャピラリは、該第一の支持体が部分的に取り除かれて露出した窓部と、該第一の支持体の一方の端部が取り除かれて露出した試料注入部とを有し、該試料注入部は該複数のキャピラリの一方の先端部を含み、窓部及び試料注入部の各部において該複数のキャピラリが軸を一平面上で並列させて配列されており、該窓部において該複数のキャピラリの軸に直交する一つの平面と各キャピラリとの交点として定義される該複数のキャピラリの検出部から、該試料注入部の先端部までの全てのキャピラリの長さが等しいことを特徴とした電気泳動部材に関する。

#### 【 0 0 0 6 】

また、本発明は、該複数のキャピラリがガラスキャピラリであることを特徴とした上記の電気泳動部材に関する。

また、本発明は、該第一の支持体が、該キャピラリ層と該第二の支持層との間に第二の接着剤層を有することを特徴とした上記の電気泳動部材に関する。

また、本発明は、該複数のキャピラリの最外層にコーティング層が形成されており、該検出部を含む該窓部の一部或いは全部で該コーティング層が剥離されていることを特徴とした上記の電気泳動部材に関する。

また、本発明は、該試料注入部での該複数のキャピラリの配列の間隔が 9 mm

の整数分の1であることを特徴とした上記の電気泳動部材に関する。

また、本発明は、該検出部前後の該複数のキャピラリを支持する第二の支持体を有することを特徴とした上記の電気泳動部材に関する。

また、本発明は、該第一の支持体が、該窓部を含む開口部を有することを特徴とした上記の電気泳動部材に関する。

【 0 0 0 7 】

また、本発明は、以下の①～③の工程を備えることを特徴とした電気泳動部材の製造方法に関する。

①第一の支持層上に形成された第一の接着剤層に、数値制御された敷設装置を用いて、複数のキャピラリを、該複数のキャピラリの軸に直行する一つの平面と各キャピラリとの交点として定義される該複数のキャピラリの検出部から、各キャピラリの一方の先端部を含む試料注入部の各キャピラリの該先端部までの長さが、全てのキャピラリで同じになるように、また少なくとも該検出部とその周辺からなる窓部及び該試料注入部各個所において、該複数のキャピラリが軸を一平面で並列させて配列されるように敷設してキャピラリ層を形成する工程；

②該キャピラリ層上に第二の支持層を積層する工程；及び

③該第一の支持層、該第一の接着剤層及び該第二の支持層を部分的に取り除いて、該複数のキャピラリの該窓部及び該試料注入部を露出させる工程。

【 0 0 0 8 】

また、本発明は、以下の①～③の工程を備えることを特徴とした電気泳動部材の製造方法に関する。

①第一の支持層上に形成された第一の接着剤層に、数値制御された敷設装置を用いて、複数のキャピラリを、該複数のキャピラリの軸に直行する一つの平面と各キャピラリとの交点として定義される検出部から、各キャピラリの一方の先端部を含む試料注入部の各キャピラリの該先端部までの長さが、全てのキャピラリで同じになるように、また少なくとも該検出部とその周辺からなる窓部及び該試料注入部各個所において、該複数のキャピラリが軸を一平面で並列させて配列されるように敷設してキャピラリ層を形成する工程；

②該キャピラリ層上に、表面に第二の接着剤層を有した第二の支持層を、第二の

接着剤層が該キャピラリ層に接するように配置して積層する工程；及び

③該第一の支持層、該第一の接着剤層、該第二の接着剤層及び該第二の支持層を部分的に取り除いて、該複数のキャピラリの該窓部及び該試料注入部を露出させる工程。

【 0 0 0 9 】

また、本発明は、該複数のキャピラリがガラスキャピラリであることを特徴とし上記の電気泳動部材の製造方法に関する。

また、本発明は、該複数のキャピラリとして、最外層にコーティング層が形成されたガラスキャピラリを用いて、該検出部を含む該窓部の一部或いは全部となる個所の該コーティング層を剥離する工程を備えることを特徴とした上記の電気泳動部材の製造方法に関する。

また、本発明は、該複数のキャピラリを敷設する際、該複数のキャピラリに荷重を加えることを特徴とした上記の電気泳動部材の製造方法に関する。

また、本発明は、該複数のキャピラリを敷設する際、該第一の接着剤層及び／又は該複数のキャピラリに、熱となるエネルギーを印加することを特徴とした上記の電気泳動部材の製造方法に関する。

また、本発明は、上記の開口部を有する電気泳動部材、及び、レーザ光線を該開口部において反射し、該複数のキャピラリの軸が並列している平面に平行な方向から、該複数のキャピラリの該検出部に照射する手段を有することを特徴とするキャピラリ電気泳動装置に関する。

【 0 0 1 0 】

【発明の実施の形態】

本発明の電気泳動部材の製造工程及び層構成を示す説明図を図 1 に、また、本発明の電気泳動部材の一態様を示す平面図を図 2 に、他の一態様を示す平面図を図 7 に示す。なお、図 2、図 3 及び図 7 中、キャピラリの配列の様子を示すために、キャピラリの露出していない部分も、一部又は全部を実線で示した。

本発明の電気泳動部材は、第一の支持層、第一の接着剤層及び第二の支持層を有する第一の支持体と、複数のキャピラリとを有し、第一の接着剤層が第一の支持層上に形成されており、複数のキャピラリが第一の接着剤層に敷設されてキャ

ピラリ層を形成している。図 1 (4) に示すように、本発明の電気泳動部材の第一の支持体は、第一の支持層 1、第一の接着剤層 2、第二の接着剤層 5 及び第二の支持層 6 を有していてもよく、この場合、第一の接着剤層 2 に敷設された複数のキャピラリ 4 からなるキャピラリ層の上に、第二の接着剤層 5 が形成され、その上に第二の支持層 6 が形成されている。複数のキャピラリ 4 は、第一の支持層 1、第一の接着剤層 2、第二の接着剤層 5 及び第二の支持層 6 からなる第一の支持体が部分的に取り除かれて露出した窓部 1 1 と、第一の支持体の一方の端部が取り除かれて露出した試料注入部 7 を有する。試料注入部 7 は、全てのキャピラリ 4 の一方の先端部を含む。キャピラリ 4 は、窓部 1 1 及び試料注入部 7 の各部において、キャピラリ軸を一平面上で並列させて配列されている。窓部 1 1 では、キャピラリ 4 は隣り合うキャピラリが接した状態で並列に配列されており、試料注入部 7 では、等間隔で並列に配列されている。キャピラリ 4 の窓部 1 1 には、キャピラリ 4 の軸に直交する一つの平面と各キャピラリ 4 との交点として定義される検出部 9 が設けられている。通常、この検出部 9 において、キャピラリ 4 にレーザ光線が照射されるため、キャピラリ 4 は、少なくともこの検出部 9 又は検出部 9 とその周辺では、透明である。

#### 【 0 0 1 1 】

例えば、本発明の電気泳動部材は、窓部と試料注入部の間のキャピラリのみが第一の支持体中で支持されていてもよいし、あるいは、図 2 に示すように、第一の支持体 A を部分的に取り除いて開口部 1 1 - 2 を設けて、キャピラリ 4 の窓部 1 1 を露出させてもよい。いずれの場合にも、例えば図 7 に示すように、キャピラリ 4 の窓部において、検出部の前後に、キャピラリ 4 を支持する第二の支持体 4 0 を設けてもよい。

第一の支持層 1 及び及び第二の支持層 6 の形状は、特に制限はないが、通常、厚み  $20\ \mu\text{m} \sim 100\ \mu\text{m}$  の平板状の形状が好適である。また、第一の支持層 1 及び及び第二の支持層 6 の材質は目的に応じて選定してよい。電気絶縁性の優れた材質としては、プリント配線板に用いられているエポキシ樹脂板やポリイミド樹脂板やフレキシブル配線板に用いられているデュポン社製のカプトンフィルムに代表されるようなポリイミドフィルム、帝人社製のテトロンフィルムに代表さ

れるようなポリエチレンテレフタレート（PET）フィルム、東レ社製のトレリナに代表されるポリフェニレンサルファイド（PPS）フィルムなどが使用できる。放熱性に優れた材質としては、アルミ、銅、SUSなどの金属板、ガラス・石英プレートなどが使用できる。金属板を用いる場合はその表面に電気絶縁用のエポキシ樹脂やポリイミド樹脂、シリコーン樹脂などの樹脂コーティング層を設けると良い。

## 【 0 0 1 2 】

第二の支持体40には石英、ガラス、SUS、プラスチック製等各材質のブロックに複数の並列するV溝を形成したV溝基板などが適する。V溝の間隔を窓部におけるキャピラリの間隔と等しくし、各V溝に各キャピラリのキャピラリ軸に平行な一部をはめ込むことにより、複数のキャピラリの等間隔の並列配置を安定に保持することができる。

## 【 0 0 1 3 】

第一の接着剤層2及び第二の接着剤層5には、粘着性のある接着剤を用いることが好ましく、たとえば、トーネックス社製のビスタネックスMML-120の様なポリイソブチレンや、日本ゼオン社製のニポールN1432等のアクリロニトリルブタジエンゴムや、デュポン社製のハイパロン20の様なクロルスルホン化ポリエチレン等を用いることができる。この場合は、これら材料を溶剤に溶解して前記第一の支持層、又は第一の支持層及び第二の支持層に直接塗布乾燥して接着剤層を形成することができる。さらに、必要に応じてこれら材料に架橋剤や難燃剤などを目的に応じて配合することもできる。また、日東電工社製No. 500等のアクリル樹脂系接着剤や、スリーエム社製のA-10、A-20、A-30等の両面粘着テープ、ダウコーニングアジア社製のシリコーン接着シートS9009等のシリコーン樹脂系接着剤などを使用できる。この場合は前記第一の支持層、又は第一の支持層及び第二の支持層の表面に直接ラミネートして使用する。

## 【 0 0 1 4 】

本発明に用いられるキャピラリとしては、例えば、市販のガラスキャピラリが使用できる。最外層にガラス保護用の樹脂がコーティングされているものが好ま

しい。このような樹脂材料にはポリイミド樹脂、シリコーン樹脂、フッ素樹脂、エポキシ樹脂などが適する。最外層にガラス保護用の樹脂がコーティングされたガラスキャピラリとして、Polymicro Technologies社製のTSP、TSG、TSUやモリテックス社製のキャピラリチューブなどがある。キャピラリの内、外径は、目的に応じて設定してよい。

## 【 0 0 1 5 】

本発明の製造方法では、第一の接着剤層への複数のキャピラリの敷設に、数値制御された敷設装置を用いる。例えば、特公昭50-9346号公報に開示されている装置がある。この装置は、導線供給始動器にて送り出された導線を、鋏止めヘッドにて稼働テーブル上に静置した粘着剤つきベース材料に、任意形状に敷設し、所定位置にて導線をカッターで切断する装置である。本発明の方法に適用する場合、導線の代わりにキャピラリを、接着剤つきベース材料の代わりに、第一の接着剤層付き第一の支持層を用いる。キャピラリを敷設する際、キャピラリを急激に、また鋭角に曲げると折れやすい等の問題があるが、これらを防ぐため、キャピラリの敷設を滑らかな円弧状に行うことによって、キャピラリの折れや応力を局所的に残すことなく敷設できる。

キャピラリを敷設する際、第一の接着剤層及び／或いはキャピラリに熱エネルギーを印加する方法としては、第一の支持層を固定する加工テーブルの内部にヒータを内蔵させる方法や、キャピラリや第一の接着剤層に超音波を印加させる方法やレーザー光を照射する方法がある。装置など製造者の都合で選択してよい。

## 【 0 0 1 6 】

試料注入部7と窓部11のサイズ等の仕様は、適用する装置などに合せて設計しなければならない。試料注入部7と窓部11では、第一の支持体A（即ち、第一の支持層1、第一の接着剤層2、第二の接着剤層5及び第二の支持層6）は取り除かれ、キャピラリ4は露出している。試料注入部7と窓部11の露出したキャピラリ4は等間隔に並列していなければならない。また、窓部11内においてキャピラリの軸と直交する所定の平面とキャピラリの交点として定義される検出部9から試料注入部7の先端部8までのキャピラリの長さが等しく設計されていなければならない。間隔や長さの公差は測定精度との兼ね合いで設定すればよい。

。高精度の測定を行う場合は、少なくとも $\pm 0.5\%$ 以下であることが望ましい。測定精度を余り求めない場合はそれ以上でも構わない。

キャピラリは、通常、互いに等しい内径及び外径を有するものが用いられ、窓部 1 1 におけるキャピラリの間隔は、キャピラリの外径と等しくして隣り合うキャピラリが接するようにすることが好ましい。試料注入部 7 におけるキャピラリの間隔は、試料の入ったウェルの間隔と等しくすることが好ましい。また、全キャピラリの試料注入部 7 の先端部 8 は、一直線上に位置するようにそろえることが好ましい。

#### 【 0 0 1 7 】

また、保護コーティングを設けたキャピラリを用いる場合、該コーティング層を窓部 1 1 の少なくとも測定のための照射光や励起光の妨げにならない範囲を剥離しなければならない。通常、光の照射や受光は、検出部 9 にて行うので、剥離は検出部 9 の前後 1 mm ～ 5 mm の範囲で行う必要がある。この値については、測定装置の仕様に基づいて決めなければならない。

#### 【 0 0 1 8 】

窓部 1 1 と試料注入部 7 の第一の支持体を取り除くには、手作業で剥離する方法、レーザー光で剥離する方法、特開 2 0 0 2 - 0 8 2 0 9 4 号公報で開示されたオゾンアッシャーやプラズマアッシャーで剥離する方法などがある。また、これらの各方法を併用しても良い。手作業で剥離する場合、過剰な力が加わりキャピラリの位置ずれや折損が起こる場合があるので、作業には十分な注意が必要である。レーザー光やアッシャーを用いる方法は、キャピラリの配列精度確保や折損防止の観点から特に有効である。また、キャピラリの最外層に設けた保護用の樹脂コーティング層を剥離するには、レーザー光で剥離する方法、オゾンアッシングやプラズマアッシングで剥離する方法を用いると良い。

#### 【 0 0 1 9 】

第二の支持層（図 1（4）の態様では、表面に第二の接着剤層 5 が形成された第二の支持層 6）を積層するには各種の方法が考えられる。一般的なプレス法を使用する場合は、キャピラリに大きな力が加わり破損することを防ぐため、プレス条件の設定には注意が必要である。真空ラミネート法を用いて、予めチャンバ

一内を真空状態にした後に低圧で圧着するので、キャピラリに大きな力が加わることなく折損の発生も防ぐことが出来る。

## 【 0 0 2 0 】

その後、必要に応じて、第一の支持体を所定の外形に加工する。所定の外形に加工する方法としては、カッターによる切断や、所望の形に予め作製した金属製の刃型を押し当てて切断加工することができる。なお、カッターでは自動化に難があり、刃型は治工具の作製に手間がかかるため、数値制御のレーザー加工機のほうがデータの準備のみで作業できるため好ましい。また、レーザー加工機においても、切断専用の出力の大きな加工機よりも、最近プリント基板で用いられているレーザー穴あけ機のように、単位時間当りのエネルギー出力が大きく同一の場所を複数のショット数で穴あけし、穴径の半分程度ずつ移動させてゆく方式は、レーザーの焼け焦げが非常に少なく好ましい。

## 【 0 0 2 1 】

本発明のキャピラリ電気泳動装置は、本発明の電気泳動部材の内、第一の支持体がキャピラリの窓部を含む開口部を有する態様の電気泳動部材と、レーザ光線を開口部において反射し、複数のキャピラリの軸が並列している平面に平行な方向から、複数のキャピラリの検出部に照射する手段を有する。複数のキャピラリの検出部へのレーザ光線の照射は、複数のキャピラリの軸が並列している平面に平行な一方向からの照射であってもよいし、対向する二方向からの照射であってもよい。レーザ光線を反射して検出部に照射する手段としては、例えば、レーザ光線の光源と、光源からのレーザ光線を反射させるように少なくとも開口部に配置された少なくとも1つのミラー又はプリズム等からなるものが挙げられる。ミラー又はプリズムは、開口部内で、並列したキャピラリの一方の端のキャピラリに面して1個のみ配置してもよいし、両方の端のキャピラリに面するように2個を配置してもよい。後者のように配置することにより、複数のキャピラリの検出部へ、対向する二方向からレーザ光線を照射することができる。この場合、光源は2つ用いてもよいし、1つの光源からのレーザ光線をビームスプリッターで分岐させてもよい。

## 【 0 0 2 2 】



本発明のキャピラリ電気泳動装置を用いて分析を行なう場合、例えば、さらに、分離媒体及びバッファをキャピラリに供給する手段、分離媒体及びバッファが供給されたキャピラリの両端間に電圧を印加し、キャピラリ内で試料を泳動させる手段、及び、キャピラリ内を泳動する試料がレーザ光線の照射により発する蛍光を検出する手段を用いる。

### 【 0 0 2 3 】

#### 【実施例】

以下、本発明の実施例及びその比較例によって本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 実施例 1

図 1 は本発明の第 1 の実施例の製造工程図である。表面にダウコーニングアジア社製シリコン接着シート S 9 0 0 9 (厚さ  $100\mu\text{m}$ ) を第一の接着剤層 2 として有したデュボン社製カプトン 3 0 0 H (厚さ  $75\mu\text{m}$ ) を第一の支持層 1 に用いた。第一の接着剤層 2、に印加荷重と X-Y テーブルの可動を数値制御で行う日立化成工業株式会社製の敷設装置 3 を用い、Polymicro Technologies 社のポリイミド樹脂の被覆のあるガラスキャピラリ T S P 0 5 0 1 5 0 (外径  $150\mu\text{m}$ 、内径  $50\mu\text{m}$ ) 4 を 1 6 本 (4-1~4-16)、検出部 9 と試料注入部 7 の先端部 8 との間の長さが  $20\text{cm}$  になるように敷設した。敷設するキャピラリには、 $100\text{g}$  の荷重を印加した。表面にダウコーニングアジア社製シリコン接着シート S 9 0 0 9 (厚さ  $100\mu\text{m}$ ) を第二の接着剤層 5 として有したデュボン社製カプトン 3 0 0 H (厚さ  $75\mu\text{m}$ ) を第二の支持層 6 とし、真空ラミネーターを用いて積層した。外形加工はプリント基板用の小径穴あけ用途のレーザー穴あけ機を用い、パルス幅  $5\text{ms}$ 、ショット数 4 ショットで  $\phi 0.2$  の穴を  $0.1\text{mm}$  間隔で移動させて行った。検出部 9 を含む窓部 1 1 と試料注入部 7 となる個所の周囲の第一の支持体 A をキャピラリ 4 を傷つけないようにカッターで切断し、第一の支持層 1、第一の接着剤層 2、第二の接着剤層 5 及び第二の支持層 6 を手で引き剥がし、キャピラリを露出させ、サイズ  $10\text{mm} \times 20\text{mm}$  の開口部 1 1-2 を形成した。検出部 9 を含む窓部の一部 1 1-1 キャピラリ 4 の外層コーティングであるポリイミドコート層をオゾンアッシャーで除去した。

## 【 0 0 2 4 】

このようにして作製した電気泳動部材において、検出部 9 と試料注入部 7 の先端部 8 との間のキャピラリの長さを測定した結果、全て  $20\text{ cm} \pm 0.5\text{ mm}$  の長さになっていることを確認した。また、検出部 9 を含む窓部 11 のガラスキャピラリの配列ピッチは  $150\text{ }\mu\text{ m} \pm 10\text{ }\mu\text{ m}$ 、試料注入部 7 のガラスキャピラリの配列ピッチは  $4.5\text{ mm} \pm 0.1\text{ mm}$  であることを確認した。敷設部分全般にキャピラリ 4 の破損などはなかった。

## 【 0 0 2 5 】

以上のように作製した本例の電気泳動部材の外観の正面図を図 2 に、本例の電気泳動部材を用いた電気泳動システムの正面概念図を図 3 に、図 3 の電気泳動システムの主要部の側面の概略を図 4 に、図 3 の電気泳動システムを用いた測定系概略を図 5 に示す。

## 【 0 0 2 6 】

図 2 に示すように、第一の支持体 A は、キャピラリ 4 の窓部 11 を包含する開口部 11-2 を有している。また、開口部 11-2 の両側には、取り付け用の穴 10 a、10 b が開けられている。キャピラリ 4 の保護用被覆であるポリイミドコーティングは、検出部を含む窓部の 1 部 11-1 において、オゾンアッシャーにより除去されている。本実施例では、検出部を含む窓部の 1 部 11-1 においてのみポリイミドコーティングを除去したが、窓部 11 の全部においてコーティングを除去してもかまわない。この窓部 11 内にある検出部 9 にて、キャピラリ内を泳動される試料への励起光の照射と誘起された蛍光の検出を行う。窓部 11 及び試料注入部 7 では、キャピラリ 4 (4-1~4-16) は、軸を一平面で平行にして配置されている。キャピラリ 4 の試料注入部 7 は試料注入部 7 の先端部 8 から上方 10 mm の範囲で第一の支持体 A (第一の支持層 1、第一の接着剤層 2、第二の接着剤層 5 及び第二の支持層 6) が取り除かれて露出しており、試料注入部 7 の先端部 8 となるキャピラリ 4-1~4-16 の先端は切り揃えられている。キャピラリ 4-1~4-16 の先端にてマイクロタイタープレート 39 に用意した試料を注入する。第一の支持体 A の上端は、キャピラリ 4 が配置されている部分だけ突起 12 が設けられており、この突起 12 は分離媒体の充填に利用

される。

【 0 0 2 7 】

図 3 に示すように、電気泳動部材 1 3 は、温調板 1 4 上に固定された位置決めピン 1 5 a、1 5 b を穴 1 0 a、1 0 b に通すことにより精密に位置決め及び固定される。温調板 1 4 は表面を絶縁処理されたアルミ板であり、その裏側に取り付けられたペルチェ素子 2 9 によって温度が所定の値に保たれる。ペルチェ素子 2 9 で発生した熱あるいは冷気はヒートパイプ 3 0 によって側方に逃され、ファン 3 1 によって大気中に廃棄される。

【 0 0 2 8 】

電気泳動部材 1 3 の突起 1 2 は、T 字状の流路を有する分岐ブロック 1 6 の 1 つの流路に挿入され、ゴム製ガスケットによってシールされる。分岐ブロック 1 6 の残りの流路の一方はチューブ 2 0 によって分離媒体が充填されたシリンジ 1 7 に接続され、他方の流路はチューブ 1 9 を介してバッファブロック 1 8 ないの流路に接続される。チューブ 1 9 及びチューブ 2 0 は内径 1 mm のテフロン（登録商標）チューブ、分岐ブロック 1 6 とバッファブロック 1 8 は透明なアクリル製で、その流路内径は 1 mm である。バッファブロック 1 8 内の流路はブロック内で折れて鉛直上方に向いた後に、直径 3 0 mm の甕状に広がったバッファータンク 1 8 a に接続する。バッファブロック 1 8 内の流路とバッファータンク 1 8 a の連結部 1 8 b は、ピストン 2 1 の上下によって開閉される。この連結部 1 8 b が開の状態ではシリンジ 1 7 が押されて、分離媒体がチューブ 1 9、2 0 の内部とそれらを繋ぐ分岐ブロック 1 6 の流路、及びバッファブロック 1 8 内の流路に充填される。バッファータンク 1 8 a は上方が開放されており、そこからバッファが所定の量注入される。その後ピストン 2 1 が下がってバッファブロック 1 8 の流路が閉じた状態でシリンジ 1 7 が再び押され、分離媒体が今度は電気泳動部材 1 3 のキャピラリー 4 に充填される。シリンジ 1 7 は電動ステージ 2 4 によって押され、ピストン 2 1 の上下は電動ソレノイド 2 2 によって行われる。分離媒体としてはアクリルアミド、ヒドロキシエチルセルロースの水溶液などを好適に用いることができる。バッファとしては、例えば、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、ホウ酸、EDTA を主成分とする水溶液（以下、

T B E と略す) 等を好適に用いることができる。

#### 【 0 0 2 9 】

キャピラリ 4 の下端は各キャピラリに対応した 1 6 本の突起部を有する電極 2 7 と共にバッファ槽 3 2 内のバッファーに浸かっている。バッファブロック 1 8 内のバッファーには電極 2 3 が浸かっている。電極 2 7、2 3 に接続された高圧電源 2 8 により、キャピラリ 4 の上端と下端の間に高圧が印加される。

#### 【 0 0 3 0 】

図 4 に示すように、バッファ槽 3 2 とマイクロタイタープレート 3 9 が電動 x z ステージ 2 5 に載っている。電動 x z ステージ 2 5 が動くことによってキャピラリ 4 の下端がマイクロタイタープレート 3 9 の測定対称となる試料ウェルに浸かった状態で、高圧電源 2 8 によって試料注入が行われ、その後に再び試料注入部 7 の先端部 8 がバッファ槽 3 2 に戻った状態でキャピラリ 4 の上端と下端の間に高圧が印加され、キャピラリ 4 内に注入された試料が電気泳動分離がなされる。電気泳動部材 1 3 のキャピラリ 4 の検出部 9 には、レーザ光線がプリズム 2 6 - 1、2 6 - 2 によって、キャピラリの軸が並列している平面に平行で、かつ軸に直角な対向する二方向から照射されており、試料が電気泳動されてこの点に到着した時に蛍光が誘起され、試料が検出される。

なお、分離媒体の充填、試料注入、電気泳動などの一連の操作はコンピュータ制御によって全自動で行われる。

#### 【 0 0 3 1 】

図 5 は、温調板 1 4 の背後にある蛍光を励起・検出する光学系を示す図 3 の矢印 X - X 断面図である。光源 3 4 は波長 5 9 4 n m、8 m W のヘリウムネオンレーザである。レーザから放出されたレーザ光線はビームスプリッタ 3 5 で 2 分割され、ミラー 3 3 - 1、3 3 - 2、3 3 - 3 及びプリズム 2 6 - 1 ~ 2 6 - 4 によって、キャピラリ 4 の検出部 9 に両側から照射される。ビームスプリッタ 3 5 を透過したレーザ光線は、開口部 1 1 - 2 内に位置するプリズム 2 6 - 1 によって反射され、窓部 1 1 内においてキャピラリ 4 が並列した平面に平行な方向から、キャピラリ 4 の軸に直角に、検出部 9 に照射される。ビームスプリッタ 3 5 の反射光については、プリズム 2 6 - 2 によって、先のレーザ光線と対向する方向

から同様にキャピラリ 4 の検出部 9 に照射される。両端のキャピラリ 4 - 1 及び 4 - 1 6 に照射された光は、特開平 0 9 - 0 9 6 6 2 3 号公報に記されているように、キャピラリ自身のレンズ効果により、発散することなく次々と隣のキャピラリへと照射される。レーザ光線を 2 分割して両側から照射したことにより反射によるロスもキャンセルされ、全 1 6 本のキャピラリ 4 内を透過する光量のばらつきは  $\pm 2 0 \%$  以内となる。キャピラリ 4 から試料によって放射された光 L はカメラレンズ 3 6 a によって平行光束にされ、バンドパスフィルタ 3 7 で試料からの蛍光以外の背景光を除去した後に第 2 のカメラレンズ 3 6 b で撮像素子 3 8 の光電面に 1 : 1 で結像される。撮像素子 3 8 は画素ピッチ  $2 5 \mu\text{m}$  の CCD であるので、各キャピラリ 4 からの蛍光を分離して検出することができる。

なお、本実施例ではビームスプリッタ 3 5 によってレーザ光線を 2 分割し、キャピラリの検出部 9 の両側から照射したが、キャピラリの本数が本実施例より少ない場合、例えば 4 本ならば、レーザ光線を 2 分割することなく、片側からの照射でも十分である。その場合、ビームスプリッタ 3 5 はミラーで代用され、ミラーとプリズムの個数は半分にできる。

#### 【 0 0 3 2 】

図 6 は第 1 の実施例によって得られた、キャピラリからの蛍光強度の時間変化である。試料は Applied Biosystems 社の GeneScan Size Standard 500 Rox であり、500 bp までの末端を ROX で標識された DNA が含まれている。この試料をホルムアミドで  $1/20$  に希釈し、DNA を一本鎖の状態にしてキャピラリ 4 に注入した。図 6 のピークに付記された数値は、ピークに対応する DNA の塩基長である。分離媒体としては同社の POP 6 (アクリルアミド水溶液) を、バッファーとしては TBE を使用し、泳動電界は  $500 \text{ V/cm}$  とした。放熱効率が良いため、このような高電界でも良好な電気泳動図を短時間で得ることができた。なお、本実施例では ROX 標識された DNA の断片長解析を行っているが、フィルタの替わりに回折格子を用いて蛍光を分光することにより、シーケンスも勿論可能である。

#### 【 0 0 3 3 】

マイクロタイタープレート 3 9 のウェル間隔は一般に 9 mm の整数分の 1 であ

るので、本発明によるキャピラリアレイ下端のキャピラリの間隔としては9 mmの整数分の1を好適に用いることができる。本実施例では整数を2とし、間隔を4.5 mmとしたので、384 ウェルのマイクロタイタープレート39に好適に用いることができる。96 ウェルのマイクロタイタープレート39を使用するには、整数を1とし、キャピラリ下端の間隔を9 mmにすればよいのはもちろんである。

## 【0034】

## 実施例2

図7は本発明の第2の実施例である。本実施例はキャピラリアライメント用の精密なV溝を有する第二の支持体40（プラスチック製）を設けて、検出部9の前後でガラスキャピラリを支持するようにした。この結果、キャピラリに照射される光量の一様性が向上し、±10%以内におさまった。また、測定系の構造を単純化するため、第一の支持層1、第一の接着剤層2、第二の接着剤層5及び第二の支持層6の、キャピラリ4の試料注入部7と反対側の検出部9を含む部分に位置する部分を全て取り除いた。なお、41はフェラルであり、中心に穴があいた円柱形をしている。キャピラリは束ねられてその穴に通され、すきまが接着剤で埋められている。このようにアレイの端の外径を円柱状にすることによって、シールがし易くなり、泳動媒体充填時により高い圧力を使用することが出来、短時間で充填できるという効果がある。図8は第二の支持体40の拡大図であり、(A)は図7と同様の正面図、(B)は側面図、(C)は下方図である。図8に示されたように第二の支持体40はキャピラリ4を支持する16列のV溝があり、また、キャピラリ4の検出部9が来る位置には四角い溝が設けられ、照射される光をさえぎらないようになっている。

## 【0035】

## 【発明の効果】

以上に説明したとおり、本発明によって、精度よくキャピラリを配列することのできる電気泳動部材と、そのような電気泳動部材を効率よく製造する方法を提供することができる。また、この方法ではキャピラリの大部分の周囲から空気の層を無くせるため、放熱効率が向上し、従来のキャピラリアレイよりも大きな電

圧勾配がかけられ、極めて高速な分析が実現できる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

第 1 の実施例の工程図である。

【図 2】

図 1 の工程後に外形加工して得られた電気泳動部材の正面図である。

【図 3】

図 2 の電気泳動部材を用いた電気泳動装置の正面概念図である。

【図 4】

図 3 の電気泳動装置の主要部の右側面図である。

【図 5】

図 3 の電気泳動装置を用いて蛍光を励起・検出する光学系を示す図 3 の X - X 断面図である。

【図 6】

実施例 1 によって得られた電気泳動図である。

【図 7】

実施例 2 の電気泳動部材の正面図である。

【図 8】

図 7 に示した第二の支持体 4 0 の拡大図である。

【符号の説明】

- 1 第一の支持層
- 2 第一の接着剤層
- 3 数値制御の敷設装置
- 4 キャピラリ
- 5 第二の接着剤層
- 6 第二の支持層
- 7 試料注入部
- 8 試料注入部の先端部
- 9 検出部

A 第一の支持体

1 0 a、1 0 b 穴

1 1 窓部

1 1 - 1 検出部を含む窓部の一部

1 1 - 2 開口部

1 2 突起

1 3 電気泳動部材

1 4 温調板

1 5 a、1 5 b 位置決めピン

1 6 分岐ブロック

1 7 シリンジ

1 8 バッファブロック

1 8 a バッファータンク

1 8 b 連結部

1 9 チューブ

2 0 チューブ

2 1 ピストン

2 2 電動ソレノイド

2 3 電極

2 4 電動ステージ

2 5 電動 x z ステージ

2 6 - 1、2 6 - 2、2 6 - 3、2 6 - 4 プリズム

2 7 電極

2 8 高圧電源

2 9 ペルチェ素子

3 0 ヒートパイプ

3 1 ファン

3 2 バッファーク

3 3 - 1、3 3 - 2、3 3 - 3 ミラー



3 4 光源

3 5 ビームスプリッタ

L 放射された光

3 6 a、3 6 b カメラレンズ

3 7 バンドパスフィルタ

3 8 撮像素子

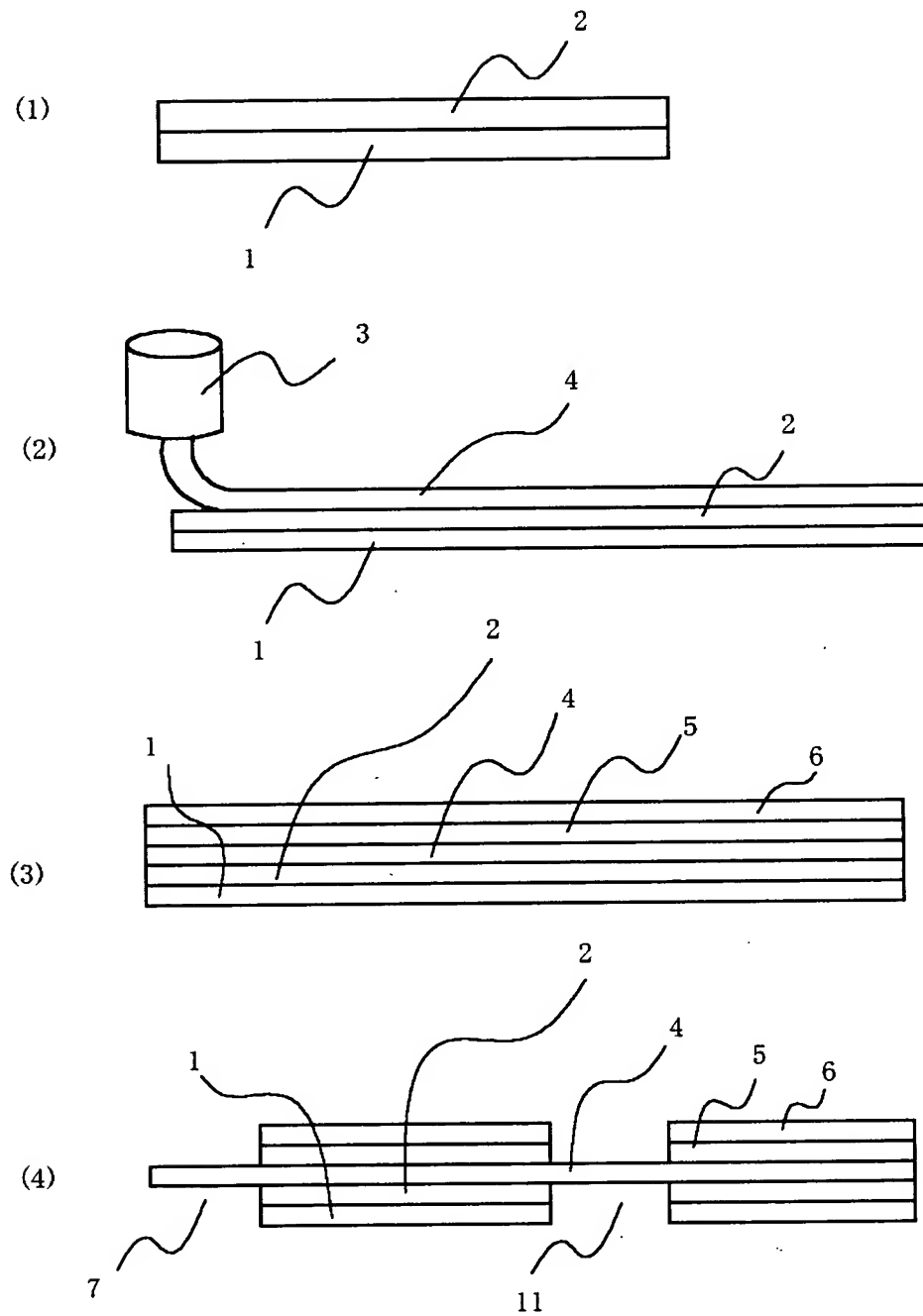
3 9 マイクロタイタープレート

4 0 第二の支持体

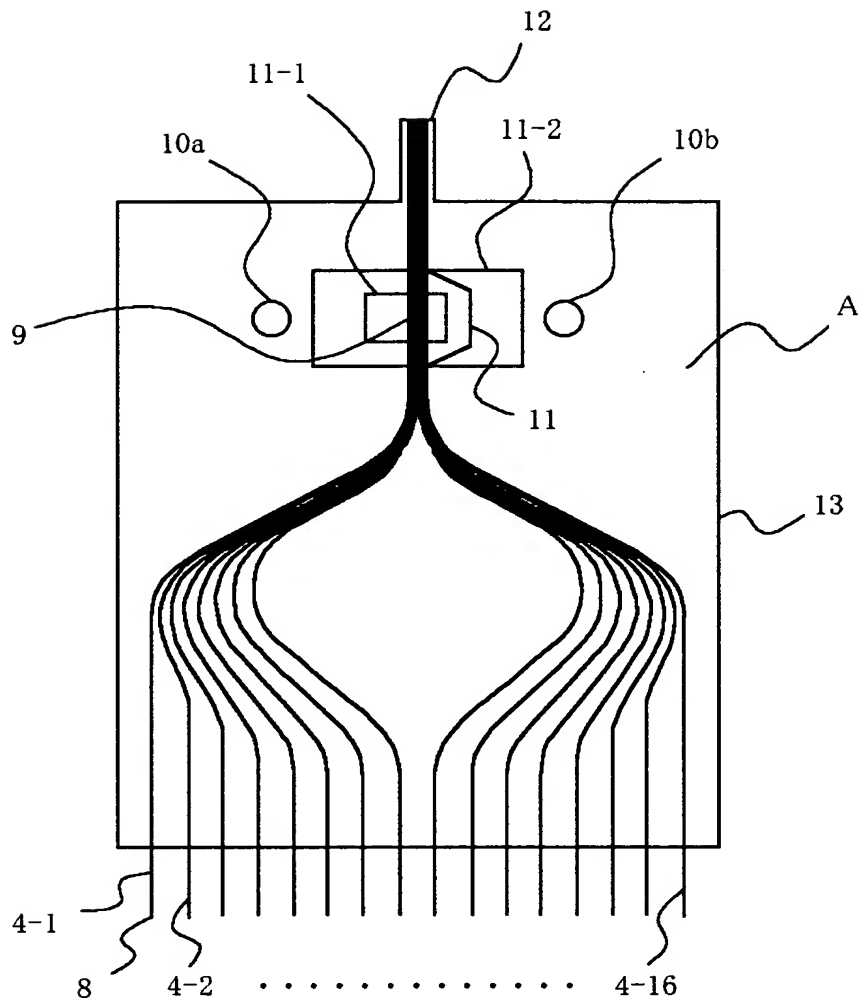
4 1 フェラル

【書類名】 図面

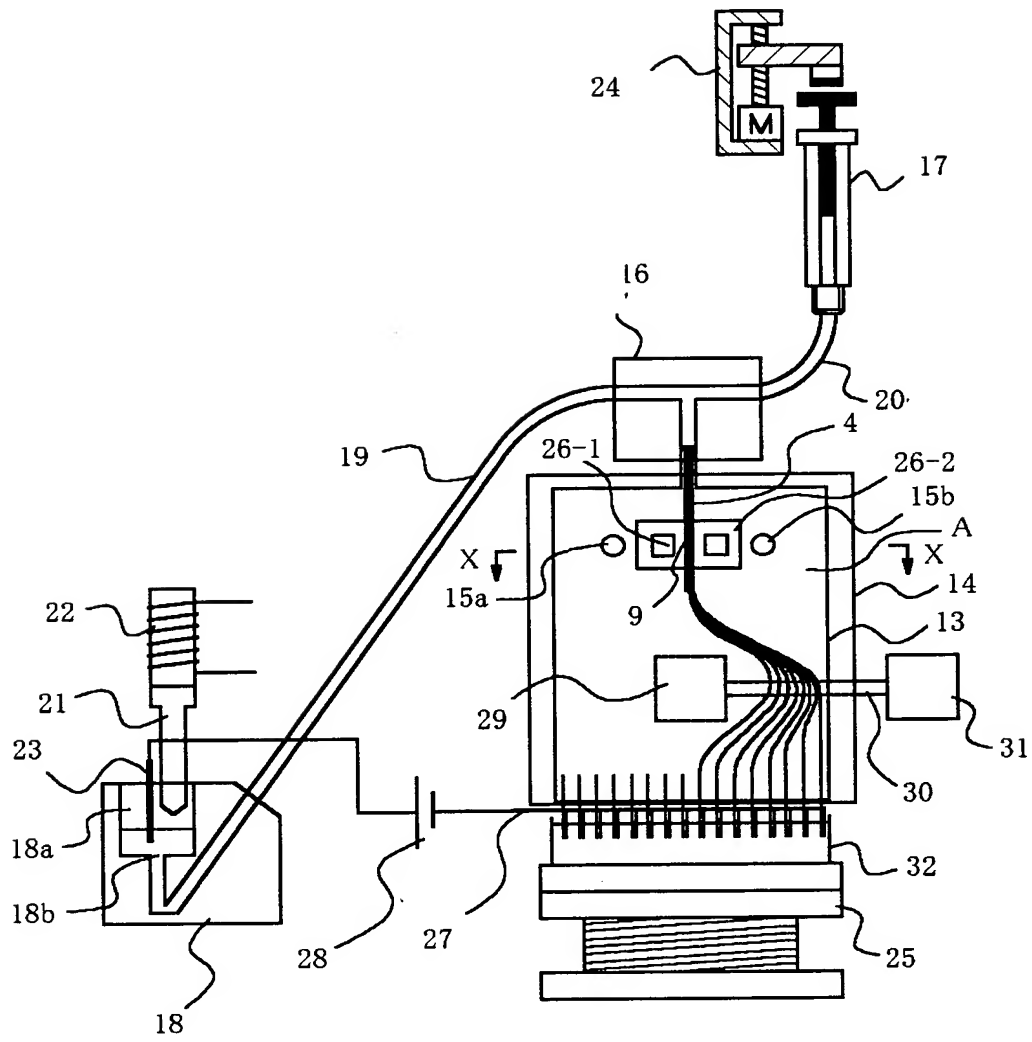
【図 1】



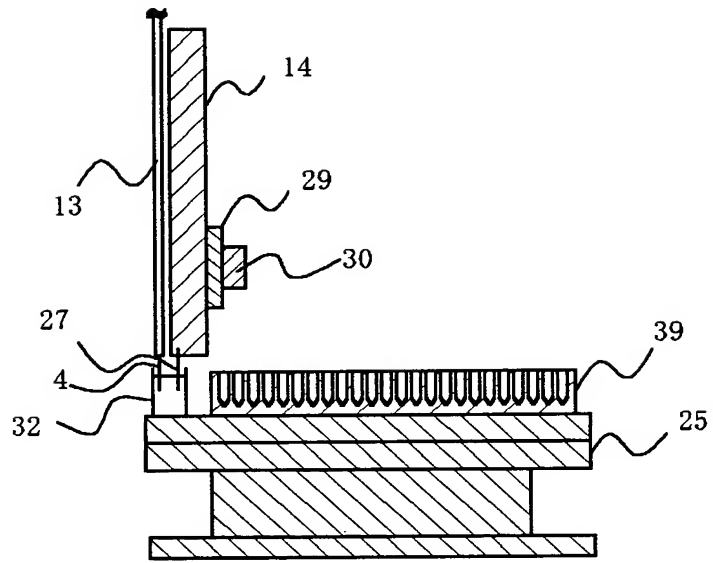
【図 2】



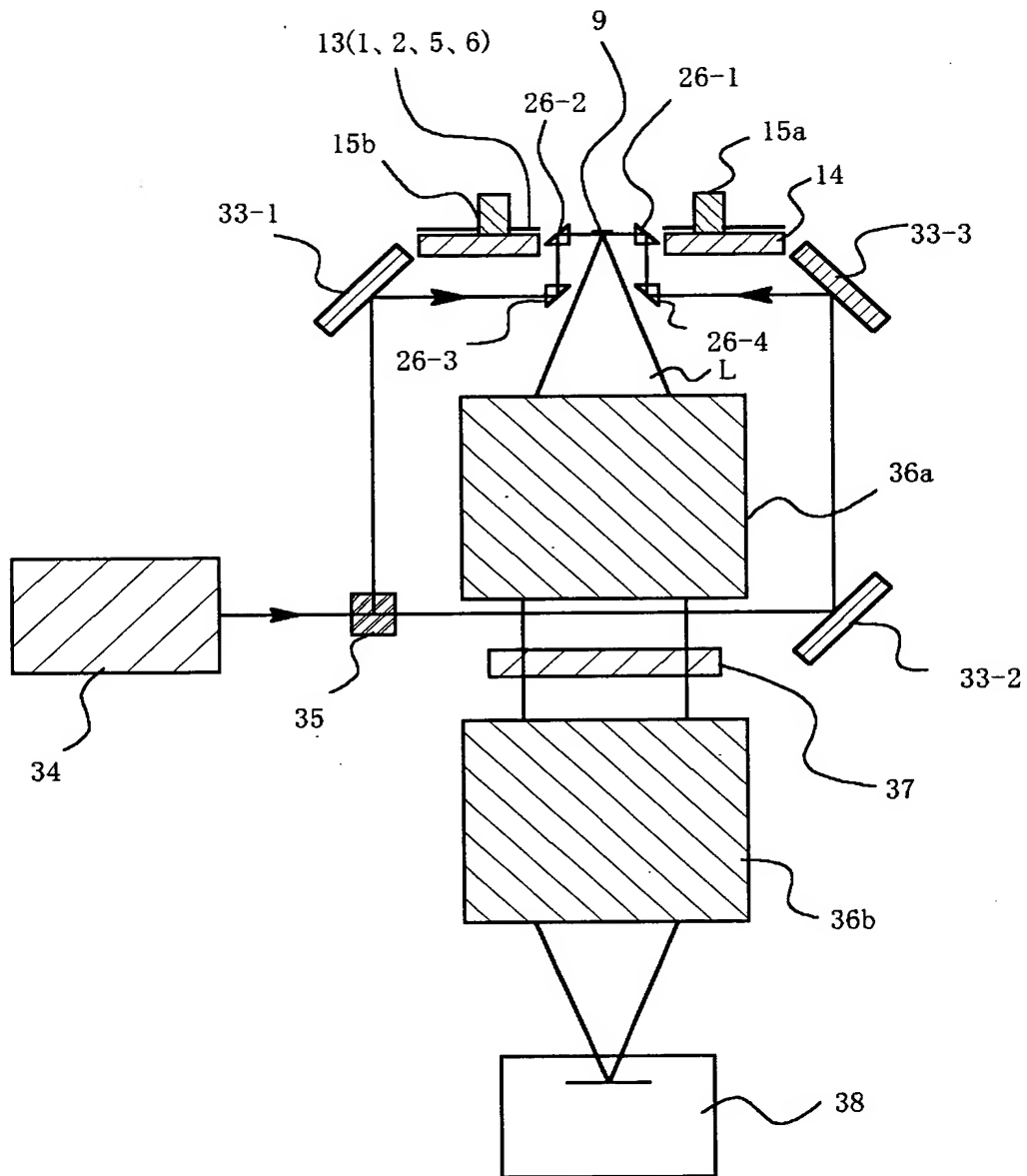
【図 3】



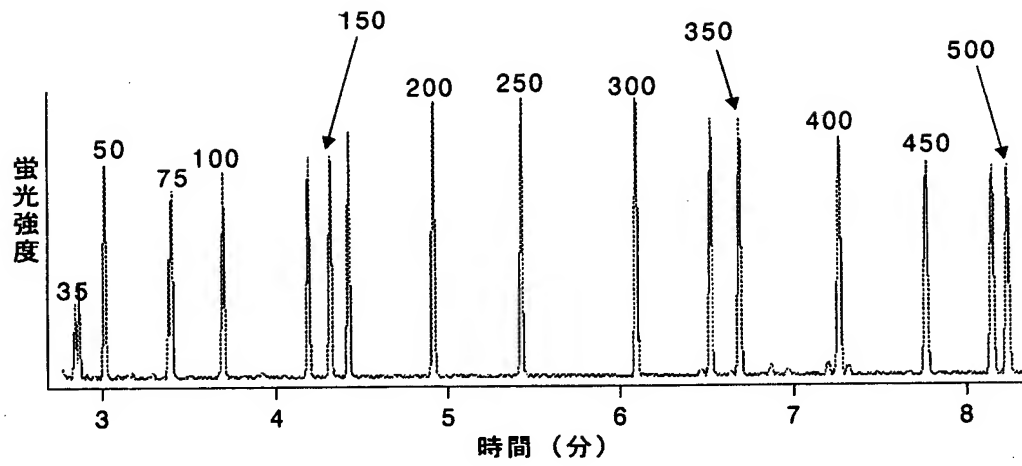
【図 4】



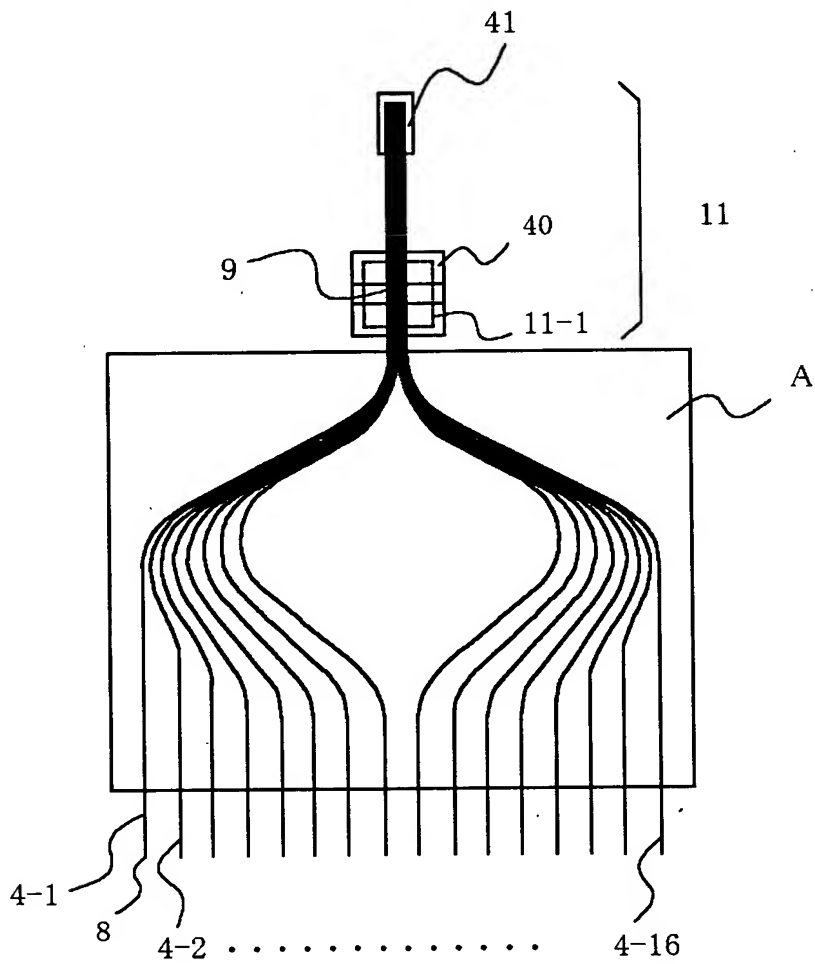
【図 5】



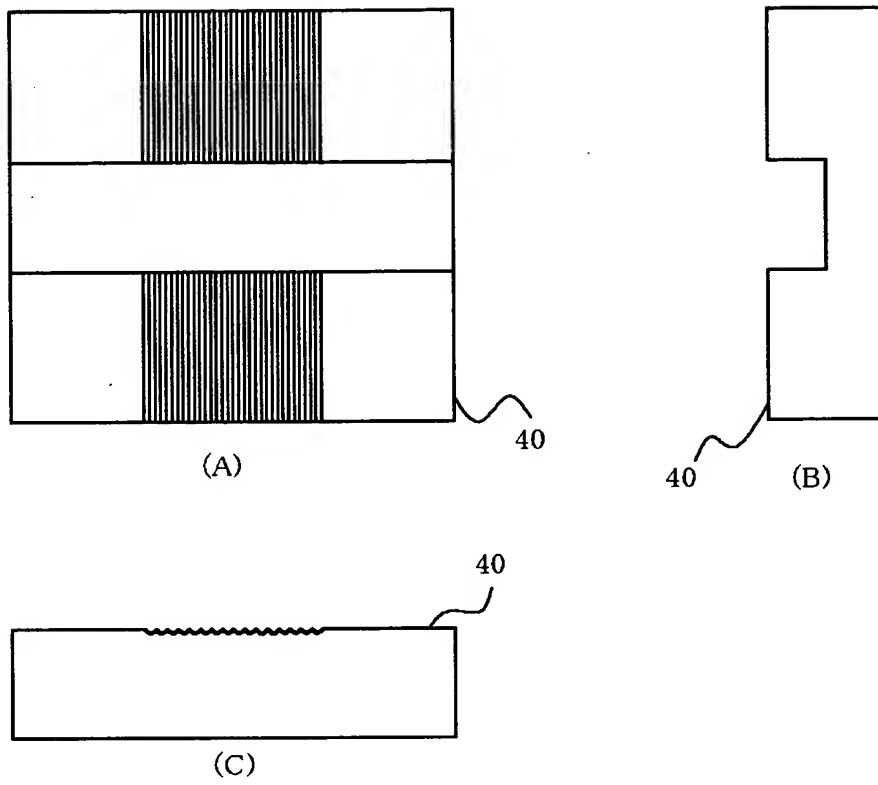
【図 6】



【図 7】



【図 8】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 精度よくコンパクトにキャピラリが配列され、取り扱い易く、放熱効率の良い電気泳動部材を提供する。

【解決手段】 第一の支持層、第一の接着剤層及び第二の支持層を有する第一の支持体と複数のキャピラリとを有する電気泳動部材であって、第一の接着剤層が第一の支持層上に形成されており、複数のキャピラリが第一の接着剤層に敷設されてキャピラリ層を形成しており、該キャピラリ層上に第二の支持層が形成されており、キャピラリは、第一の支持体が部分的に取り除かれて露出した窓部と、第一の支持体の一方の端部が取り除かれて露出した試料注入部とを有し、窓部及び試料注入部の各部においてキャピラリが軸を一平面上で並列させて配列されており、窓部においてキャピラリの軸に直交する一つの平面と各キャピラリとの交点として定義されるキャピラリの検出部から、試料注入部の先端部までの全てのキャピラリの長さが等しい電気泳動部材。

【選択図】 図 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 4 4 5 5 ]

1. 変更年月日	1 9 9 3 年 7 月 2 7 日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都新宿区西新宿 2 丁目 1 番 1 号
氏 名	日立化成工業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 5 1 0 8 ]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 3 1 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地
氏 名	株式会社日立製作所